

学生実験のための卵白フラボプロテインの簡易精製法の検討

堀江 信之

Simple Purification of Ovoflavoprotein for an Experimental Biochemistry Course

Nobuyuki HORIE

抄 録

卵白フラボプロテインは、卵白中に含まれるリボフラビン(ビタミンB₂)結合タンパク質で、卵白の黄色の原因となっているタンパク質である。大学教育課程における生化学実験の題材として、卵白からの卵白フラボプロテインの簡易精製法について検討した。この方法では、セルロフィンA-200の樹脂を用いて、pHの異なる2種類の溶出液を用いた一段階のカラムクロマトグラフィーによりタンパク質の純度として95%の卵白フラボプロテイン溶液を収量78%で得ることができた。この方法は短時間で実験を行うことができるので、生化学実験の題材として優れており、また、精製法の原理として等電点の前後でタンパク質の電荷が異なることを利用していることから、タンパク質の高分子の性質を学ぶ上での教材としても利用価値が高い。

キーワード：卵白フラボプロテイン，タンパク質精製，生化学実験，SDSポリアクリルアミド電気泳動

緒 言

タンパク質は、生体の機能分子として核酸と並ぶ重要な物質であり、特に生命機能を司る生体物質という意味で大学基礎課程での生化学の主要な学習項目の一つである。タンパク質は、遺伝情報により一定の配列を持ち、一定の立体構造を持つという特徴を持つ。その機能を理解するためには、高分子であることと、両電解質の性質を持つことなどを理解する必要がある。そのために、大学の教育課程では生化学実験の項目として、タンパク質の物理化学的性質を理解するためにカラムクロマトグラフィーやSDSポリアクリルアミド電気泳動などを取り入れるのが一般的である。しかしながら、カラムクロマトグラフィーによるタンパク質精製は一般に多くの時間と手間を要するため、時間的制約の大きい学生実験ではブルーデキストランを用いた分子量分画のモデル実験などにとどまることが多い。身近な材料を用いて、単品のタンパク質精製を行える素材は、大学基礎課程での生化学実験では有用な教材と考えられる。

卵白は薄い黄色を呈し、その色は卵白に含まれるリボフラビン(ビタミンB₂)由来であることが知られている。卵白フラボプロテインは卵白中に存在し、リボフラビンを1:1で結合

しているタンパク質である¹⁾。卵白中のビタミン結合タンパク質としてはアビジンが有名だが、本タンパク質はリボフラビンに対する結合性が比較的弱いことから、リボフラビンの輸送タンパク質としての機能を持っていると考えられている。ニワトリのゲノムは2004年にゲノム解析が行われている²⁾。卵白フラボプロテインは、8番染色体にあるRBP遺伝子にコードされており、この遺伝子は、238のアミノ酸をコードしている^{3,4)}。一方、卵白フラボプロテインは、アミノ酸残基219、分子量30-32kの糖タンパクであることが報告されている⁵⁾。等電点は、3.9-4.1であり⁶⁾、またリン酸化されることが知られている^{6,7)}。

このタンパク質は、黄色を呈するために、目視での確認が可能あり、比較的容易にイオン交換クロマトグラフィーで精製が可能である。著者らは、生化学実験での題材として、短時間での精製法について検討したので報告する。

実験材料と方法

1. 実験材料

(1) 試薬

陰イオン交換樹脂は、セルロファインA-200 (JNC Corp.製) を用いた。

タンパク質量には、Protein Assay Dye (Bio-Rad社製) を用いた。

(2) 陰イオン交換クロマトグラフィーによる卵白フラボプロテインの精製

卵白は、ブレンダーを用いて均一化したのち、0.1mol/L酢酸アンモニウム緩衝液 (pH4.3) に対して、2日間透析したものをを用いた。透析後、沈殿が生じたため、遠心により取り除き上清を用いた。

セルロファインA-200は、濾過により保存用のエタノールを除いたのち、2～3倍容量の0.1mol/L酢酸アンモニウム緩衝液 (pH4.3) で洗浄し平衡化した。平衡化した樹脂を直径1.5cmのミニカラムに約1cmの高さになるように充填した。(樹脂量として約2ml)

さらに6.0mlの0.1mol/L酢酸アンモニウム緩衝液 (pH4.3) を流して平衡化したのちに、透析した卵白溶液を15.0ml添加した。

次に、6.0mlの0.1mol/L酢酸アンモニウム緩衝液 (pH4.3) を流して、カラムに吸着していないタンパク質を溶出させた。さらに、0.8mol/LのNaClを含む0.1mol/L酢酸アンモニウム緩衝液 (pH3.5) を30ml流して、カラムに吸着したタンパク質を溶出した。

卵白溶液をカラムに加えた時から、カラムからの溶出液を0.5mlずつ集め、タンパク質量を行った。また、リボフラビンの存在を確認するために、溶出液の410nmの吸光度をプレートリーダー (Bio-Rad社製, xMark Microplate Spectrophotometer) を用いて測定した。

(3) SDSポリアクリルアミド電気泳動による精製度の測定

タンパク溶出後、10% SDSポリアクリルアミド電気泳動を行い、溶液中に含まれるタンパク質を分析した。タンパク質濃度の測定より、1 mg/ml以上の濃度の分画については、1.0mg/mlになるように希釈したのち、SDS電気泳動サンプル調製用緩衝液 (EzApply, Atto社製) と1 : 1の割合で混合し、各レーン当たり、20 μ L (タンパク量として10 μ g相当) をのせ電気泳動を行った。電気泳動後、Quick-CBB (和光純薬) により染色した。染色後のゲルを撮影

後, ImageJ⁸⁾を用いて, 卵白フラボプロテイン由来と考えられるのバンドの濃さから, 卵白フラボプロテインの精製度を測定した.

結 果

卵白を均一化し, 透析したのちの溶液のタンパク質濃度を定量したところ, 50.0mg/mlであった. この溶液15.0mlをカラムにかけ, タンパク質の分離を行った. 卵白溶液をカラムにかけると, 樹脂の上部に黄色い層が観察され, 卵白フラボプロテインがゲル上部に黄色い層として吸着していることが観察された. その後, pH4.3の緩衝液でカラム洗浄しても, 黄色いバンドには変化がなかった. 緩衝液をpH3.5のものに変えると, 速やかに黄色い層が移動し, カラムから黄色の溶液として卵白フラボプロテインを含む分画が溶出した. 卵白溶液をカラムにかけた時から, 0.5mlずつ分取した各分画の, タンパク質濃度, A_{410} での吸光度およびタンパク質1 mg/ml当たりの吸光度をグラフ1に示す. 回収された溶液のうち, A_{410} が0.1を超える分画 (No.42~No.45)は, 肉眼で観察した場合も黄色い色が観察された. この分画を卵白フラボプロテイン分画とした.

各分画のタンパク質濃度を0.1mg/mlに調整し, タンパク質10 μ g相当を10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した. 染色後のゲルの様子を図1. に示す. 先に述べた, 卵白フラボプロテインを含む分画であるNo.42からNo.52にかけて, 分子量約31kDのタンパク質が観察された. 卵白フラボプロテインの分子量は, 32kDと報告されており⁷⁾, このバンドが, 卵白フラボプロテインに相当すると考えられる. この分画の電気泳動の結果 (図1, レーン6

卵白フラボプロテインのセルフラインA-200による精製

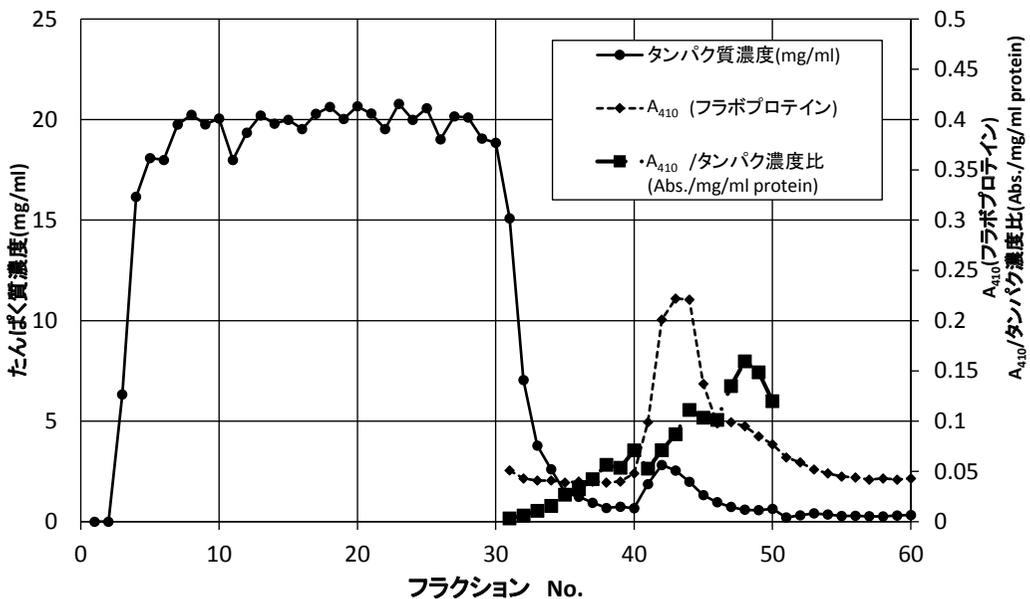


図1. 卵白フラボプロテインのセルフラインA-200による精製

～9) から、卵白フラボプロテインの純度を検討した。ImageJを用いたデンシトメトリーの結果から、この分画の卵白フラボプロテインに相当すると考えられるバンドに含まれる分子量約31kDのタンパク質の純度は、95%であった。また、タンパク質量の結果より、卵白フラボプロテイン分画 (No.42～No.45) に含まれるタンパク質量を計算すると、4.8mgとなった。

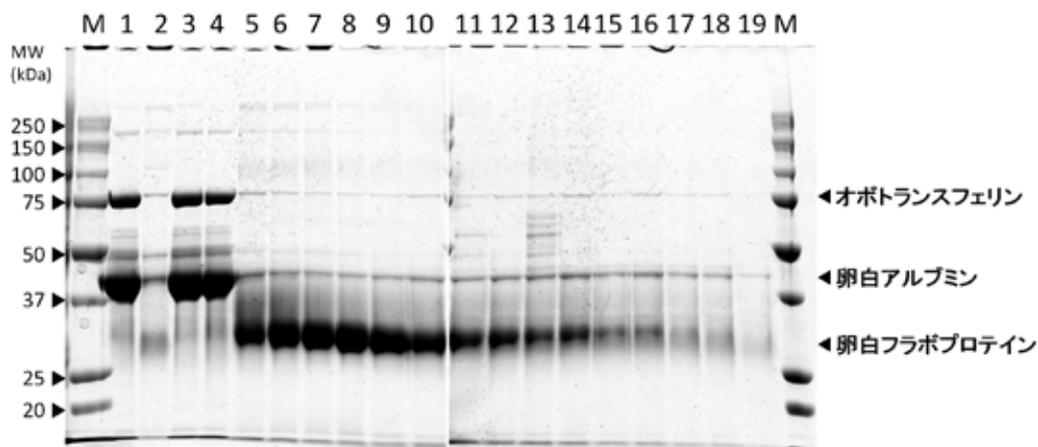


図2. カラムに添加した試料およびカラムから溶出した分画のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析

M: marker; レーン1: 卵白タンパク; レーン2: カラムへの試料添加中に生じた沈殿; レーン3から、レーン19は分画した溶液
3: No.3; 4: No.33; 5: No.41; 6: No.42; 7: No.43; 8: No.44; 9: No.45; 10: No.46; 11: No.47; 12: No.48; 13: No.49; 14: No.50; 15: No.51; 16: No.52; 17: No.53; 18: No.54; 19: No.55; (No.は分画No.を示す.)

考 察

卵白全タンパク中の卵白フラボプロテインの含量は、卵白全タンパク質の0.8%程度と報告されている⁷⁾。今回の精製法では、 A_{410} が0.1を超える分画を卵白フラボプロテインフラボプロテイン分画として分析した。これは、No.42～No.45の分画で、溶出液が黄色を呈することから目視でも分取が可能であった。電気泳動による分析では、この範囲に分子量約31kDのバンドが認められ、結果で述べたとおりこのタンパク質が卵白フラボプロテインであると推定された。このバンドはSDSポリアクリルアミド電気泳動で用いたマーカータンパク質などに比べて、やや広い幅のバンドとなっており、これは卵白フラボプロテインが糖鎖をかなり含む(14%)タンパク質であることによると考えられる。電気泳動像から求めた卵白フラボプロテインの純度を考慮すると、精製過程全体を通しての卵白フラボプロテインの収量は4.5mgとなった。これは、カラムにかけた全タンパク量(747mg)の0.60%に相当する。電気泳動で観察された31kDのバンドが卵白フラボプロテインであると仮定すると78%の収率で卵白フラボプロテインが精製されたことになる。電気泳動像でもほぼ単一バンドとなっており、一段階の精製で効率よく卵白フラボプロテインを精製することができたと考えられる。

今回の条件では、pHを変えた緩衝液を用いて、卵白溶液から一段階の処理で卵白フラボプロテインを精製した。卵白フラボプロテインの等電点は3.9-4.1と報告されており⁶⁾、今回の条件ではpH4.3の条件では、タンパク質全体が陰イオンとして存在するが、pH3.5の緩衝液では陽

イオンとなることが予想される。卵白に含まれるほかのタンパク質は、オボムコイドを除いていずれも4.1より高い等電点を持つためにpH4.3の条件では陽イオンとなり、負の電荷をもった物質を吸着する陰イオン交換樹脂に吸着しなかったと考えられる。

等電点の理解は、生化学の学習項目としても重要である。等電点は両性電解質の電荷の総計がゼロとなるpHと定義され、等電点より小さいpHではその分子のマイナスの電荷が、大きい場合はプラスの電荷が多くなる。電荷の総計という概念については、アミノ酸のような低分子の場合にはそれぞれの解離基が少数であることから電荷数の統計的な理解が必要なのに対し、タンパク質のような高分子の場合は非常に多くの解離基をもち、一方ではそれぞれの解離基のミクロ環境の違いから異なるpKaを持つために、そのpHでの電荷の総計という概念のイメージがつかみやすい利点がある。本実験の場合、電荷の総計の変化（タンパク質全体として陰イオンから、陽イオンへの転換）がバンドの移動として観察されるため、等電点の理解の教材として優れていると考えられる。

これまでもイオン交換樹脂を用いて簡便な方法で卵白フラボプロテインを精製できることが報告されているが^{9, 10)}、ほとんどの場合は、pHが一定の溶媒を用いて、イオン強度の異なる溶出液でグラディエント溶出を行ってタンパク質を分離している。タンパク質の精製という観点からは、その方がタンパク質の分離能は向上するが、時間の制約の大きい学生実験では適した方法とは言えない。本実験の方法では、タンパク質の吸着から溶出までが30分程度で実行でき、カラムの充填も含めて90分の授業で実行可能である。

タンパク質の精製の観点から考察を加えると、今回行った方法は学生実験を対象とした簡易精製であるためにいくつかの問題点もある。1つは、精製された卵白フラボプロテインが均一のタンパク質であるかということである。カラム溶出液のタンパク量の測定結果を見ると、溶出されたタンパク質は2つの山を形成しており、ともに、410nmの吸光度のピークと重なっているために両者とも卵白フラボプロテインを含んでいることは確かであるが、タンパク重量当たりの吸光度で見ると後ろの低い山のほうがタンパク質当たりの吸光度が大きいことがわかる。ただし、吸光度の値が非常に低い領域であるため、比吸光度のデータに関しては、誤差が大きい可能性もある。

陰イオン交換樹脂で精製した場合、卵白フラボプロテイン分画が2つのピークを形成することはこれまでの報告と一致しており^{9, 10)}さらに、日高らの報告では、2つの分画を合わせてゲルろ過クロマトグラフィーで単一ピークとなることを確認している⁹⁾。

また、電気泳動の結果では、明らかに通常のタンパク質よりバンド幅が広がっている。報告によれば、卵白フラボプロテインは糖鎖を14%程含み^{6, 7)}、またリン酸化される⁶⁾ことから糖鎖やリン酸化の不均一性により、2つの山に分かれたり、電気泳動でのバンド幅が広がることが考えられる。

もう1つの問題として、卵白に含まれるオボムコイドが本実験での精製品に混入している可能性が考えられる。オボムコイドは、卵白に11%ほど含まれる糖タンパク質で⁷⁾、卵アレルギーのアレルゲンとして有名である。その等電点は4.1と報告されており、分子量も28kDであることから⁷⁾、本実験で用いた2種類のpHの溶出液を用いる方法では同じ位置に溶出する可能性がある。

卵白のオボムコイドについては、廣瀬らにより少なくとも5種の分子種からなり、等電点は3.7-4.4までの広い範囲に分布していることが報告されている¹¹⁾。これらのことから、グラディエント法を用いたイオン交換樹脂による分析では複数のピークに分かれて溶出することが予想

される。卵白フラボプロテインとは分子量も近いことから、近い位置に溶出することが予想されるが、これまでの陰イオン交換樹脂による卵白フラボプロテインの簡易精製ではオボムコイドの溶出位置については言及されていない^{9, 10)}。この原因については不明だが、卵白オボムコイドが等電点の異なる複数の分子種からなることから、かなり広範囲にわたって複数のピークとして溶出していることが考えられる。今回のクロマトグラフィーでの溶出パターンが過去の陰イオン交換樹脂での卵白フラボプロテインの精製の様子と酷似していること、文献によってはさらにクロマトグラフィーを用いて卵白フラボプロテインの純度についてほぼ単一種であることを確認していること⁹⁾、また、今回の実験のタンパク質の回収量から考えて、今回の精製方法でも過去の文献と同程度の純度の卵白フラボプロテインが精製されていると考えられる。

オボムコイドのSDSポリアクリルアミド電気泳動については、通常のタンパク質と異なる挙動を示すことが報告されている^{12, 13)}。オボムコイドのアミノ酸組成から計算される分子量は20.1kDであるが、SDSポリアクリルアミド電気泳動では30kDから40kDの範囲にあることが報告されている¹²⁾。この原因については不明である。比較的新しいAbeyrathneらの報告によると、オボムコイドは精製法によりSDSポリアクリルアミド電気泳動で異なる分子量を与えることがあり、その範囲は35.2から40.1kDの範囲にあることが報告されている¹³⁾。この結果は、オボムコイドがSDSポリアクリルアミド電気泳動で、今回精製された卵白フラボプロテインより大きな分子量を与えることを示唆している。このことから今回の精製法により精製された卵白フラボプロテインには顕著な量のオボムコイドは含まれておらず、卵白フラボプロテインの純度は十分高いことが推測される。

結 語

学生実験に適用可能なタンパク質精製実験方法の確立を目的として、卵白に含まれる卵白フラボプロテインの簡易精製法について検討した。この精製法では、カラムの充填も含めて90分の授業内で行うことができ、卵白フラボプロテインを一段階の陰イオンクロマトグラフィーによりSDSポリアクリルアミド電気泳動の分析でほぼ単品になるまで精製することができた。この方法は、目的とするタンパク質の電荷が等電点を挟んだpHを持つ2種類の溶液で異なること、また電荷の違いによる陰イオン交換樹脂への吸着を直接色の違いとして目視で観察できるなど、等電点の理解や解離基の性質を理解させる上でも有用な教材と考えられる。

謝 辞

本研究の試料調整などで協力いただいた、本学技術職員の神田恵氏に感謝いたします。

Abstract

Ovoflavoprotein is a riboflavin (vitamin B₂) -binding protein contained in egg white and is the protein that causes the yellow color of egg white. As a subject of biochemical experiments

in the university curriculum, a simple method for purifying ovoflavoprotein from egg white is described. By this method, purified ovoflavoprotein solutions with a protein purity of 95% was obtained with a yield of 78% by one-step column chromatography (Cellulofine A-200 resin) using two kinds of buffer solutions with different pHs. The method is suitable as a subject in the biochemical experiment course, because the experiment can be performed in a short time. Furthermore, it is highly useful as a teaching material for learning the properties of a protein as a macromolecule because the principle of the purification method is the difference in the charge of the protein in the solutions with pH higher or lower than the isoelectric point of the target protein.

Keywords: ovoflavoprotein, protein purification, biochemical experimental course, SDS polyacrylamide gel electrophoresis

文 献

1. Monaco, H. L. : Crystal structure of chicken riboflavin-binding protein. *EMBO J.*, **16**, pp.1475-1483 (1997) .
2. Hillier, L. W., Miller, W., Birney, E., Warren, W., Hardison, R. C., Ponting, C. P., Bork, P., Burt, D. W., Groenen, M. A. M., Delany, M. E., Dodgson, J. B., Chinwalla, A. T., Cliften, P. F., Clifton, S. W., Delehaunty, K. D., Fronick, C., Fulton, R. S., Graves, T. A., Kremitzki, C., *et al.* : Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, **432**, pp.695-716 (2004) .
3. Gene: RBP (ENSGALG00000010293) - Summary - Gallus_gallus - Ensembl genome browser 103. Available at: https://asia.ensembl.org/Gallus_gallus/Gene/Summary?db=core;g=ENSGALG00000010293;r=8:21595383-21606407;t=ENSGALT00000038387. (Accessed: 22nd March 2021)
4. KEGG T01006: 396449. Available at: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?gga:396449. (Accessed: 22nd March 2021)
5. Becvar, J., and Palmer, G. : The binding of flavin derivatives to the riboflavin-binding protein of egg white. A kinetic and thermodynamic study. *J. Biol. Chem.*, **257**, pp.5607-5617 (1982) .
6. Rhodes, M. B., Bennett, N., and Feeney, R. E. : The Flavoprotein-Apoprotein System of Egg White. *J. Biol. Chem.*, **234**, pp.2054-2060 (1959) .
7. 食品機能性科学編集委員会. : *食品機能性の科学*, p.391. (産業技術サービスセンター, 2008) .
8. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. : NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, pp.671-675 (2012) .
9. HiDAKA, Y., and Matsooka, Y. : Simple Procedure of Preparation of Egg White Flavoprotein. *Nippon NÅgeikagaku Kaishi*, **51**, pp.165-166 (1977) .
10. Rao, P.-F., Liu, S.-T., Wei, Z., Li, J.-C., Chen, R.-M., Chen, G.-R., and Zheng, Y.-Q. : Isolation of Flavoprotein from Chicken Egg White by a Single-Step DEAE Ion-Exchange Chromatographic Procedure. *J. Food Biochem.*, **20**, pp.473-479 (1996) .
11. 廣瀬優子, and 木戸詔子. : 食物アレルギー・卵白オボムコイドの不均一性とアレルギー性 : その1. 卵白から3種類のオボムコイドの分離. *京都女子大学食物學會誌*, **57**, pp.25-32 (2002) .
12. Kovacs-Nolan, J., Zhang, J. W., Shigeru Hayakawa, A., and Mine, Y. : Immunochemical and Structural Analysis of Pepsin-Digested Egg White Ovomuroid. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, pp.6261-6266 (2000) .
13. Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., and Ahn, D. U. : Separation of ovotransferrin and ovomucoid from chicken egg white. *Poult. Sci.*, **93**, pp.1010-1017 (2014) .

